

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.31.016

利用无传染性耻垢分枝杆菌建立小鼠结核病模型的探索*

纪文博 尚永强 臧师竹 张翠丽 姜涛[△]

(大连医科大学生物技术系 辽宁 大连 116044)

摘要 目的:利用耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis* mc2155)建立 C57BL/6 小鼠结核病模型。**方法:**每天以高剂量(5×10^7 CFU)耻垢分枝杆菌给 C57BL/6 小鼠腹腔注射,连续感染 4 周,检测耻垢分枝杆菌对小鼠的致病性。分别于 2 周和 4 周处死小鼠,无菌条件下解剖小鼠取肺、脾脏组织匀浆,进行组织内细菌活力检测;通过嗜酸性染色进行分枝杆菌的鉴定;同时进行病理切片的制备,观察肺和脾脏组织的病理变化;最后进行菌体 DNA 的提取和基因检测,根据上述指标确定小鼠结核病模型的建立是否成功。**结果:**腹腔感染小鼠 2 周后,模型组小鼠只有脾脏组织匀浆液出现抗酸染色阳性菌落,肺部组织未见阳性菌落。腹腔感染小鼠 4 周后,模型组小鼠肺、脾脏组织匀浆液中均可见大量抗酸染色阳性的菌落;组织病理学观察结果显示:小鼠肺组织主要表现为以中性粒细胞为主的炎性病变;基因检测结果表明:模型组小鼠肺组织匀浆液中可检测到耻垢分枝杆菌特异性 3-磷酸甘油醛脱氢酶(*gap*)基因,而脾脏组织未扩增出耻垢分枝杆菌特异性基因。**结论:**通过腹腔注射无致病性耻垢分枝杆菌方法,成功建立 C57BL/6 小鼠结核病发生模型,为结核分枝杆菌与宿主相互作用研究提供安全的疾病模型。

关键词:耻垢分枝杆菌;C57BL/6 小鼠;结核病模型

中图分类号:R378,R378.91+1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)31-6065-04

Establishment of Mice Disease Models on Tuberculosis Using Non-pathogenic *Mycobacteria Smegmatis**

JI Wen-bo, SHANG Yong-qiang, ZANG Shi-zhu, LIU Li-kun, JIANG Tao[△]

(Biotechnology Department of Dalian Medical University, Dalian, Liaoning, 116044, China)

ABSTRACT Objective: To establish tuberculosis mice models by using non-pathogenic mycobacteria smegmatis mc2155. **Methods:** High dose mycobacteria smegmatis mc2155 (5×10^7 CFU) were injected in mice abdominal of C57BL/6 cavity injection once per day for 4 successive weeks, so that to observe the pathogenic of mycobacteria smegmatis in mice. Inflammatory changes of lung tissue sections were observed by hematoxylin and eosin stain (HE staining); Specificity acid-fast staining method was used to identify infection capability and vitality of mycobacteria smegmatis in C57BL/6 mice lung and spleen tissue after infection 2 week and 4 week. Finally, bacteria DNA in lung and spleen tissue culture was extracted and mycobacterial smegmatis specific glyceraldehyde 3-phosphoric acid dehydrogenase gene (*gap*) were amplified by using PCR method. The feasibility of using non-infectious mycobacteria smegmatis to establish tuberculosis mice models were explored according to the above three aspects detection. **Results:** At the time of infection 2 week, it was observed rod shape mycobacteria smegmatis by using specificity oxochromatic staining in C57BL/6 mice spleen tissue culture, instead of the lung tissue. After 4 week, pathological changes for most of the alveolar cavity filled with neutrophils inflammatory lesions. Rod shape bacteria were observed by using specificity acid-fast staining in C57BL/6 mice lung tissue and spleen tissue culture. The specific glyceraldehyde 3-phosphoric acid dehydrogenase gene (*gap*) of mycobacteria smegmatis was amplified in the lung homogenate of model mice, instead spleen tissue and the control group was not. **Conclusions:** C57BL/6 mice tuberculosis model was established successfully by intraperitoneal injection method of non-pathogenic mycobacteria smegmatis. This method provides security disease models for interaction studies about mycobacterium tuberculosis and host cell.

Key words: Mycobacteria smegmatis; C57BL/6 mice; Tuberculosis models.

Chinese Library Classification: R378; R378.91+1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)31-6065-04

前言

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 是引起结核病的主要致病菌,也是寄生于人体巨噬细胞内的胞内菌。

随着传统抗结核药物在临床的长期应用,耐药菌株不断增多,开发新一代抗结核药物已成为当务之急。而目前常见的新药研发方向是以细胞壁多糖合成的关键酶为药物筛选的靶点,忽视了细菌表面大分子对宿主免疫系统的影响^[1-3]。随着研究的深

* 基金项目:辽宁省“挑战杯”大学生科技创新项目;高等学校博士学科点专项科研基金项目(20122105120014);

辽宁省教育厅科学研究一般项目(L2012315)

作者简介:纪文博(1989-),男,本科,E-mail: 976042083@qq.com

△ 通讯作者:姜涛,E-mail:jiangtaodl@163.com.

(收稿日期:2014-04-12 接受日期:2014-05-13)

入,学者逐渐发现已经找到的抗结核药物靶点较多,但病原菌与宿主相互作用的研究较少,所以,必须为开发抗结核药物寻找新的思路。

结核分枝杆菌能够同机体免疫系统相互作用,最终逃逸免疫系统的监视,从而大量扩散、繁殖,是其长期寄居于宿主体内的根本原因,也是消灭结核病的主要障碍之一^[4]。如果单纯以细胞壁多糖合成关键酶为靶点,忽视菌体自身与宿主免疫系统的相互作用,不能有效解决结核分枝杆菌免疫逃逸问题,也就无法根除侵入机体的结核分枝杆菌,这一点逐渐形成很多学者的共识。于是,学者将目光转移到结核分枝杆菌自身与宿主免疫系统的识别以及免疫效应上。而建立方便可行的结核病模型又是分枝杆菌与宿主相互作用机制研究的前提。本研究利用 C57BL/6 小鼠,以无致病性耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis* mc2155)为感染细菌,可成功建立小鼠结核病模型,为相关研究奠定基础。

多年来,研究者已利用具有传染性的结核分枝杆菌,在包括猴、豚鼠、大鼠、小鼠、兔等不同的动物体内成功复制出结核病模型^[5-7]。但利用此模型的实验必须在生物安全防护三级实验室进行操作,使研究过程受到很大限制。耻垢分枝杆菌也属于分枝菌属,与结核分枝杆菌具有相似的细胞壁结构,但无致病性^[8,9]。本研究拟利用对结核杆菌敏感的 C57BL/6 小鼠,通过腹腔注射无传染性耻垢分枝杆菌以感染小鼠,最终通过病理、细菌活力检测以及对组织内菌体扩增耻垢分枝杆菌特异性基因等方法鉴定小鼠结核病感染模型建立是否成功。本结核病模型的建立为分枝杆菌与宿主相互作用研究提供了方便、可行的平台。

1 材料与方法

1.1 菌株的制备和处理

将 *M. smegmatis* mc2155 菌株进行培养,取适量细菌(5×10^7 CFU / 只)4000r/min 离心 6min,离心后弃去上清液,在沉淀中加入含 0.05% Tween 的 PBS (PBS-T) 中,使菌体悬浮于 PBS-T 中。将装有菌体的离心管放在超声清洗器中振荡,使之成为单菌悬液。

1.2 动物模型的建立

C57BL/6 雄性小鼠,体重 25-30 g (SPF 级)购于大连医科大学实验动物中心。实验动物随机分为 2 组,分别为对照组和模型组;模型组以 5×10^7 CFU 细菌进行高浓度腹腔注射,野生型 *M. smegmatis* mc2155 菌液注射体积约 300 μ L,对照组注射等量 PBS-T 溶剂。每只小鼠按照标准剂量每日进行腹腔注射一次。各组动物分笼饲养,自由取食饮水,饲养条件保持恒温、恒湿,定期通风消毒。

1.3 实验方法

1.3.1 病理标本处理 分别在感染 2 周和 4 周后,在对各组小鼠进行眼球取血后,无菌条件下取脾、肺等组织于 4%多聚甲醛中固定后,用 OCT 包埋剂进行包埋后,冰冻切片机 10 μ m 厚度连续切片,切片做苏木精-伊红染色(Hematoxylin-Eosin, HE)后,对组织形态进行观察,观察各组小鼠感染 15 天和 30 天后肺、脾等组织的病理变化。

1.3.2 菌株的活力检测及抗酸染色鉴定 取部分肺及脾组织,在经过灭菌的组织匀浆器中,加 2 mL 经过高压灭菌的 LB 液

体培养基,研磨成匀浆,根据感染程度将匀浆液稀释一定倍数,取 50 μ L 各组织的匀浆液接种于 LB 固体培养基,放置在 37℃ 恒温培养箱培养,48 h 后观察固体平板中菌体生长情况并对固体平板上的菌落进行下面抗酸染色^[10]。将小鼠组织标本包埋切片,滴加石碳酸复红液 2-3 滴,在火焰上加热至出现蒸汽,待标本冷却后用水冲洗,然后加 3% 盐酸酒精脱色 30 s,冲洗,再用碱性美兰溶液复染 1 min,用水冲洗后用吸水纸吸干,用显微镜镜下观察,鉴定是否为抗酸染色阳性细菌生长。

1.3.3 菌体 DNA 提取和 PCR 鉴定^[11] 挑取 1.3.2 中显示的肺和脾组织匀浆液 LB 平板上的菌落,并将其接种到 5 mL 含 0.05 % Tween 80 的 LB 培养基中,在 37℃ 振荡培养 48 h 后收获菌体(离心 5000 g, 6 min)。将菌体沉淀悬浮于 250 μ L Solution I (25 % 蔗糖, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, pH 8.0, 500 g/ml 溶菌酶, 100 g/ml RNase A) 中,在 37℃ 振荡孵育过夜。加入 250 μ L Solution II (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 % SDS, 400 g ml⁻¹ Proteinase K) 后在 37℃ 振荡孵育过夜。加入 0.9 倍体积的饱和酚 / 氯仿 / 异戊醇 (25:24:1) 并充分混匀,在 12,000 g 离心 10 min,重复此步骤 2 次。将水相转移到另一个 EP 管中,依次加入 1/10 体积的 3 M NaAc (pH 5.2) 和 0.9 倍体积的异丙醇,置冰上 30 min 分种以上。在 12,000 g 离心 20 min,弃上清。用 70 % 乙醇洗涤 DNA 沉淀后,在 12,000 g 离心 5 min。空气干燥 DNA 后,用 15 μ L 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液溶解 DNA 并在 -20℃ 保存备用。以两对耻垢分枝杆菌特异性 3-磷酸甘油脱氢酶 (3-phosphoric acid glycerol dehydrogenase, gap) 引物扩增特异性 gap 基因片段,其长度分别为 445 bp 和 605 bp。引物 1 扩增片段长度为 445 bp,引物 2 扩增片段长度为 605 bp,退火温度均为 57℃,用此两对引物扩增目的基因片段,以耻垢分枝杆菌 DNA 为内对照同时进行 PCR 检测。

2 结果

2.1 小鼠的肺、脾脏组织的病理改变

各组小鼠病理切片 HE 染色显微镜下观察,与 PBS-T 对照组相比,模型组炎症反应明显。小鼠病理变化主要表现为大多数肺泡腔内充满以中性粒细胞为主的炎性病变,主要表现为肺泡内淋巴细胞浸润明显(图 1A)。脾组织大体标本见脾脏轻度肿胀,充血不明显。HE 染色未见明显病理变化(图 1B)。

2.2 耻垢分枝杆菌在组织匀浆中的细菌活力检测

小鼠肺、脾脏匀浆液接种于 LB 固体培养基后的菌落生长迅速,培养 48h 后模型组出现肉眼可见的白色针尖样大小菌落(图 2);嗜酸性染色发现:感染 2 周组只有脾脏组织匀浆液中可见染成红色的嗜酸性杆菌,堆积成团,排列无序,偶成分枝状生长,肺组织未见抗酸染色阳性菌落。而感染 4 周组在肺组织和脾脏均可见红色的嗜酸性杆菌,对照组未发现染成红色的嗜酸性杆菌的存在(图 3)。

2.3 耻垢分枝杆菌特异性基因 PCR 检测

以耻垢分枝杆菌 DNA 为阳性对照,利用 PCR 技术检测模型组和对照组小鼠肺、脾脏组织匀浆培养液中菌体 DNA 是否有耻垢分枝杆菌特异性基因产物存在。结果表明:模型组小鼠肺组织菌体 DNA 与耻垢分枝杆菌 DNA 为模板的基因产物片段大小一致,而脾脏组织未见其特异性条带扩增(见图 4)。因此,进一步证明模型组肺组织具有繁殖力较强的耻垢分枝杆菌

的存在,而脾脏组织未见活力较强的耻垢分枝杆菌。

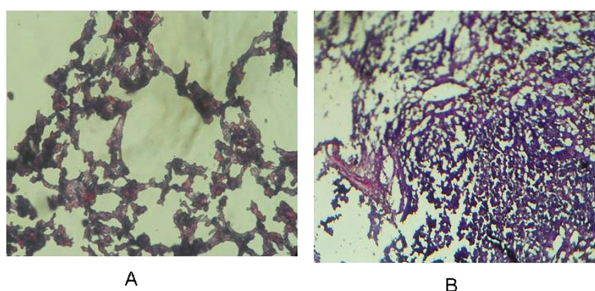


图1 模型组小鼠肺、脾脏组织 HE 染色结果 A. 肺组织;B. 脾组织
Fig.1 Hematoxylin-Eosin-stained sections of lung and spleen tissue for models group mice
A. Lung tissue; B. Spleen tissue

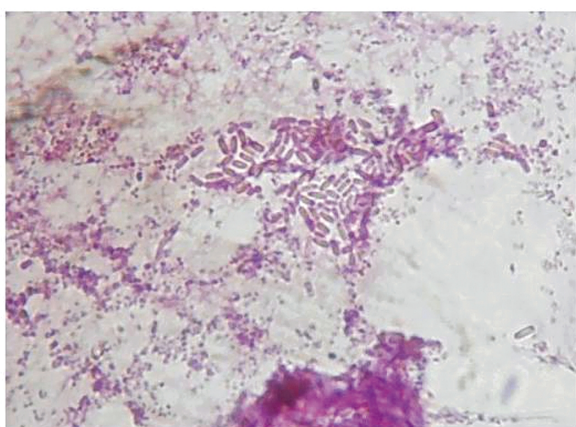


图3 模型组小鼠肺组织匀浆液细菌抗酸染色 (1000×)
Fig.3 Specibility acid-fast staining identification of mycobacteria smegmatis for lung tissue culture of model group mice (1000×)

3 讨论

分枝杆菌属是一类包含 100 余种种的古老细菌菌属,它具有独特的细胞壁结构,既是水和土壤中自由生存的共栖菌,也是人和动物的共同致病菌。目前为止,至少有 25 种分枝杆菌与人类的疾病相关,其中结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)是人类结核病的主要致病菌。

结核分枝杆菌通过空气传播并通过气道感染宿主,被贮存于肺内的巨噬细胞所吞噬,当其成功逃逸宿主免疫系统监视时,结核分枝杆菌能在这些本可以杀伤病原体的细胞内复制,主要表现为前炎症细胞因子分泌增多,免疫细胞的聚集等前炎症反应特征^[12-15]。如果细菌活力进一步战胜宿主免疫系统,便引起细菌大量繁殖,从而形成肉芽肿,发生感染症状^[16]。肉芽肿中心在活动性疾病中变成干酪似的,其中包含坏死的巨噬细胞,这就是活动性肺结核的空洞,当该结构破裂时,细菌可以扩散入新的个体,也可能通过淋巴循环引起肺外结核,如心包炎,脑膜炎或脊椎麻醉性结核病等。

耻垢分枝杆菌与结核分枝杆菌同属分枝菌属,耻垢分枝杆菌生长快速且无致病性。它们虽然具有相似的细胞壁结构和分子遗传特性,但引起宿主发生不同的免疫反应^[17]。体外实验研

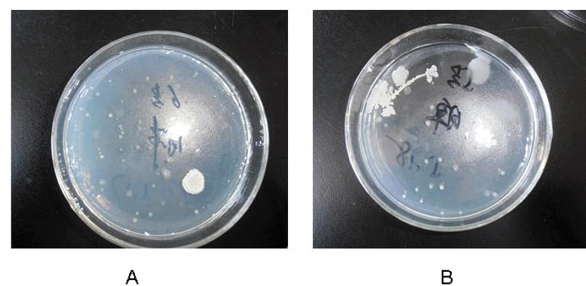


图2 模型组小鼠肺、脾脏组织匀浆液耻垢分枝杆菌活力分析 A. 肺组织;B. 脾组织
Fig.2 Vitality annalysis of mycobacteria smegmatis in lung tissue and spleen tissue homogenate for model group mice
A. Lung tissue; B. Spleen tissue

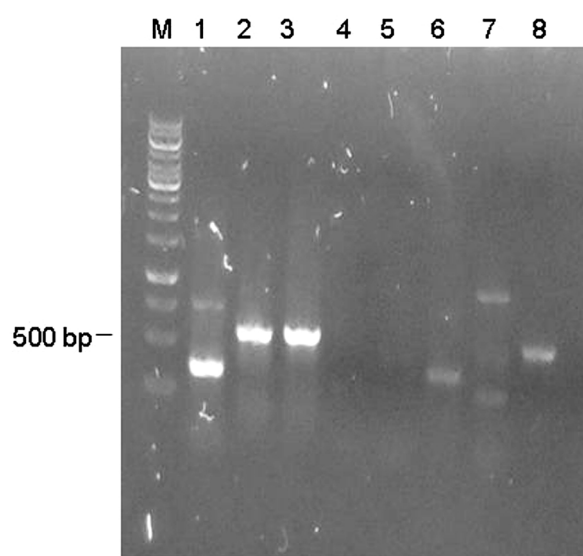


图4 组织匀浆培养液细菌 DNA 的 gap 基因的 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳分析

M: 1 Kb DNA Marker; 1-3: *M. smegmatis* mc2155 DNA 的 PCR 扩增后产物; 4-5, 对照组小鼠肺和脾脏组织 PCR 扩增后产物; 6、8, 模型组小鼠肺组织 PCR 扩增后产物; 7, 模型组小鼠脾脏组织 PCR 扩增后产物
Fig.4 PCR products were analyzed on the agarose gel electrophoresis for glyceraldehyde 3-phosphoric acid dehydrogenase (gap) gene from genomic DNA in mc2155 and tissue culture. M, 1 Kb DNA ladder; lane 1-3, PCR product of mc2155 genomic DNA; lane 4-5, PCR products of genomic DNA in the lung and spleen tissue culture for control group mice; Lane 6、8, PCR products of genomic DNA in the lung tissue culture for model group mice.; Lane 7, PCR products of genomic DNA in the lung and spleen tissue culture for model group mice.

究表明:结核分枝杆菌与耻垢分枝杆菌在巨噬细胞内的存活时间,凋亡途径以及细胞因子的分泌均不同^[18,19]。结核分枝杆菌可以在人巨噬细胞内生长、繁殖,而耻垢分枝杆菌只能引起细胞凋亡等反应^[20]。但最近文献报道,耻垢分枝杆菌可以在 C57BL/6 小鼠巨噬细胞内生长,肺部出现类似结核病的病理变化^[21]。因此,本研究利用 C57BL/6 小鼠,以无致病性耻垢分枝杆菌(*Mycobacteria smegmatis* mc2155)为感染细菌来模拟小鼠结

核病发生、发展模型,为病原菌与宿主相互作用分子机制相关研究奠定基础。

本研究结果发现:耻垢分枝杆菌感染 C57BL/6 小鼠 2 周后,小鼠脾组织内可出现嗜酸性染色阳性杆菌菌落,而肺组织只有在感染 4 周后方可见嗜酸性染色阳性菌落。说明腹腔注射耻垢分枝杆菌后,入血的分枝杆菌首先进入免疫反应活跃的脾脏中与宿主免疫细胞相互斗争后入血,进入肺部等组织器官。随着感染时间延长,可能抵抗了肺部巨噬细胞的吞噬溶酶体途径、炎症小体的形成、自噬、炎症等过程来实现其在胞内存活,出现典型的类似结核分枝杆菌感染的病理改变,因此,该模型中耻垢分枝杆菌与肺部巨噬细胞的相互作用过程与结核病患者发病过程相似。

组织匀浆检测细菌活力发现:肺组织匀浆液中可见嗜酸性染色阳性杆菌菌落,并进一步通过分子生物学方法得到确认为,该菌落为有活力的耻垢分枝杆菌。在脾脏组织中,感染 2 周可见有活力的耻垢分枝杆菌存在,而耻垢分枝杆菌感染 C57BL/6 小鼠 4 周后脾脏组织中未见有活力的阳性耻垢分枝杆菌存在。其进一步说明结核病的发病是分枝杆菌与免疫细胞相互作用的结果,脾脏和其他组织免疫细胞可能对病原菌的有较强的抵抗力,而肺部免疫细胞可能由于免疫能力相对较弱,不能抵抗分枝杆菌的攻击而产生病理变化。所以,肺部免疫细胞在其特殊的环境诱导下,可能产生其不同的分化方向,也可能是免疫耐受机制研究的新的方向。

参考文献(References)

- [1] Lee RE, Brennan PJ, Besra GS. Mycobacterium tuberculosis cell envelope[J]. Curr.Top.Microbiol Immunol, 1996, 215: 1-27
- [2] Huang H, Scherman MS, D'Haese W, et al. Identification and active expression of the Mycobacterium tuberculosis gene encoding 5-phospho- {alpha}-d-ribose-1-diphosphate: decaprenyl-phosphate 5-phosphoribosyltransferase, the first enzyme committed to decaprenyl-phosphoryl-d-arabinose synthesis [J]. J.Biol.Chem, 2005, 280: 24539-24543
- [3] Sonawane A, Mohanty S, Jagannathan L, et al. Role of glycans and glycoproteins in disease development by Mycobacterium tuberculosis [J]. Crit Rev Microbiol, 2012, 38: 250-266
- [4] Stanley SA, Cox JS. Host-Pathogen interactions during mycobacterium tuberculosis infections[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2013
- [5] 李任翔,刘先洲,唐志佼,等.结核分枝杆菌急性感染小鼠模型的建立 [J].公共卫生与预防医学, 2007, 18(5): 12-14
Li Ren-xiang, Liu Xian-zhou, Tang Zhi-jiao, et al. Establishment of mouse model of acute infection with Mycobacterium tuberculosis[J]. Journal of Public Health and Preventive Medicine, 2007, 18(5): 12-14 (In Chinese)
- [6] 王平,王丽梅,张薇,等.结核分枝杆菌 Ag85B-ESAT-6 融合蛋白重组耻垢分枝杆菌对小鼠的免疫原性研究[J].中国防痨杂志, 2012, 34(3): 145-149
Wang Ping, Wang Li-mei, Zhang Wei, et al. Immunogenicity of the recombinant M.smegmatis expressing Ag85B-ESAT-6 fusion protein of M.tuberculosis in mice [J]. Chinese Journal of Antituberculosis, 2012, 34(3): 145-149 (In Chinese)
- [7] 杨春,徐蕾,伊正君,等.重组耻垢分枝杆菌对小鼠结核病免疫治疗效果的评价[J].免疫学杂志, 2007, 23(4): 357-361
Yang Chun, Xu Lei, Yi Zheng-jun, et al. Therapeutic effects of GLS/IL-12 recombinant M.smegmatis in murine model of M. tuberculosis infection[J]. Immunological Journal, 2007, 23(4): 357-361 (In Chinese)
- [8] Riendeau CJ, Kornfeld H. THP-1 cell apoptosis in response to Mycobacterial infection[J]. Infect Immun, 2003, 71: 254-259
- [9] Bohsali A, Abdalla H, Velmurugan K, et al. The non-pathogenic mycobacteria M. smegmatis and M. fortuitum induce rapid host cell apoptosis via a caspase-3 and TNF dependent pathway [J]. BMC Microbiol, 2010, 10: 237
- [10] 张为民,龚文波. 荧光定量 PCR 检测结核杆菌 DNA 与涂片抗酸染色结果的比较[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(23): 103-106
Zhang Wei-min, Gong Wen-bo. A comparative analysis of the results between fluorescence quantitative PCR detection of mycobacterium tuberculosis DNA and smear acid-fast staining [J]. The Journal of Practical Medicine, 2010, 26(23): 103-106 (In Chinese)
- [11] 高鹏,张润玲,刘燕玲. 荧光定量 PCR 方法探讨黄芪注射液对巨噬细胞吞噬结核杆菌的影响 [J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(10): 231-233 (In Chinese)
Gao Peng, Zhang Run-ling, Liu Yan-ling. Effect of Astragalus root injection on mycobacterium tuberculosis [J]. Journal of the military medical university, 2005, 26(10): 231-233
- [12] Pan JH, Lou WL, Zhou HQ, et al. Inoculation of bacille calmette guerin combined with intraperitoneal adenosine injection enhances antibacterial effect of macrophage against Mycobacterium tuberculosis in mice [J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2004, 42:932-935
- [13] Esin S, Counoupas C, Aulicino A, et al. Interaction of Mycobacterium tuberculosis cell wall components with the human natural killer cell receptors NKp44 and Toll-like receptor 2[J]. Scand J Immunol, 2013, 77: 460-469
- [14] Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, et al. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96: 14459-14463
- [15] Mishra AK, Alves JE, Krumbach K, et al. Differential arabinan capping of lipoarabinomannan modulates innate immune responses and impacts T helper cell differentiation [J]. J Biol Chem, 2012, 287: 44173-44183
- [16] Birkness KA, Guarner J, Sable SB, et al. An in vitro model of the leukocyte interactions associated with granuloma formation in mycobacterium tuberculosis infection [J]. Immunol Cell Biol, 2007, 85: 160-168
- [17] Sweeney KA, Dao DN, Goldberg MF, et al. A recombinant Mycobacterium smegmatis induces potent bactericidal immunity against Mycobacterium tuberculosis[J]. Nat Med, 2011, 17:1261-1268
- [18] Bansal K, Trinath J, Chakravorty D, et al. Pathogen-specific TLR2 protein activation programs macrophages to induce Wnt-beta-catenin signaling[J]. J Biol Chem, 2011, 286: 37032-37044
- [19] Olin MR, Hwa CK, Lee J, et al. Gammadelta T-lymphocyte cytotoxic activity against Mycobacterium bovis analyzed by flow cytometry[J]. J Immunol Methods, 2005, 297: 1-11
- [20] Erokhin VV, Zemskova ZS. Current views of tuberculosis inflammation[J]. Probl Tuberk, 2003: 11-21
- [21] Kunichan AD, Sokolova GB, Perel'man MI. Effect of glutoxim in the combination with antitubercular agents of the second choice on the growth of drug resistant Mycobacteria tuberculosis in the cultured murine lung tissue[J]. Antibiot Khimioter, 2002, 47: 18-21